

Praktické použití reakce kvasící mladiny s m-fenylendiaminem

Ing. Jan ŠAVEL, Ing. Marie PROKOPOVÁ, Ing. Dana ZDVIHALOVÁ

B. Budvar, n.p. České Budějovice

Klíčová slova: mladina, m-fenylendiamin, dusičnany

663.45

1. ÚVOD

Významu dusičnanů v pivovarství se poslední dobou věnuje velká pozornost [1-4]. Z dusičnanů mohou vznikat činnosti kontaminujících bakterií dusitany, které reagují se složkami mladiny za tvorby zdraví škodlivých netěkavých nitrosaminů (ATNC). Tvorba dusitanů při kvašení je nejčastější příčinou vzniku ATNC při výrobě piva [5]. Obsahu dusičnanů se v odborné literatuře věnuje mnoho prací [6,7].

V předchozím sdělení jsme prokázali, že tvorba dusitanů v kvasící mladině se může sledovat barevnou reakcí s m-fenylendiaminem (m-FDA) [8,9]. m-FDA reaguje s dusitany, vznikajícími při kvašení činností bakteriální kontaminace za tvorby oranžového až červeného barviva s charakteristickým absorpčním maximem při 450 nm.

Na přítomnost dusitanů se podle této reakce usuzuje podle rozdílného tvaru absorpčních spekter kvasící mladiny bez přídavku m-FDA a s ním. Předpokládáme, že pro zjednodušení bude postačovat měření rozdílu absorbancí obou kvasících mladin při 450 nm. Tímto postupem se zabývá naše sdělení.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie a roztoky

Hydrochlorid tetracyklinu (Biotika, s.p.), 85% kyselina fosforečná (H_3PO_4) (Lachema, s.p.), 1% roztok 1,3 fenylendiaminu (Merck-Schuchardt) v sterilní vodě.

2.2 Citrátový tlumivý roztok

Citrátový tlumivý roztok (Mc Ilvaine) se připravil smíšením roztoků 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny citronové a 0,2 mol.l⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného [7].

2.3 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra se měřila v 10 mm skleněných kyvetách proti destilované vodě v spektrofotometru CADAS 100 (Dr. Bruno Lange), řízeném osobním počítačem s použitím software PCSCAN. Stejný přístroj se používal pro ostatní spektrofotometrická měření.

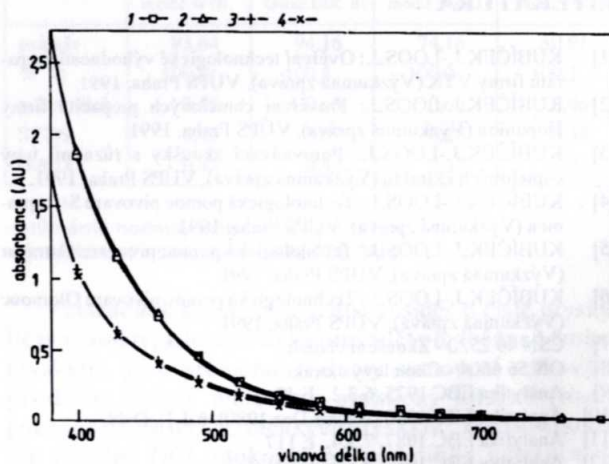
2.4 Test na tvorbu dusitanů v kvasící mladině

K 10 ml čerstvě zakvašené mladiny se přidá 0,25 ml 1% m-FDA ve sterilní vodě. K souběžně připravenému vzorku se přidá ještě 0,1 ml 1% vodného roztoku hydrochloridu tetracyklinu (TTC). Oba vzorky se kultivují při 20 °C po dobu 3 až 5 dní, pak se vzorky odstředí (15 min, 4000 min⁻¹) a stanoví se rozdíl absorbancí obou vzorků. Hydrochlorid tetracyklinu potlačuje většinu bakteriální kontaminace mladiny.

3. VÝSLEDKY

3.1 Reakce m-FDA s 12% mladinou

12% mladina (pH 5,5) se upravila 85% H_3PO_4 na pH 4,7, obě mladiny se za studena sterilovaly membránovou filtrací filtry 0,20 μm (Minisart RC 25, Sartorius AG, SRN) a k mladinám se přidal 1% sterilní roztok m-FDA ve výsledné koncentraci m-FDA 0,25 g.l⁻¹. Absorpční spektra mladin se měřila po 24 h při 20 °C proti destilované vodě (obr.1).



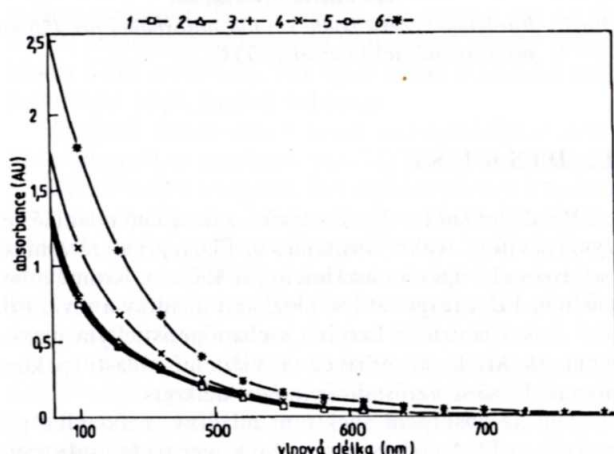
Obr.1 Absorpční spektra sterilních 12% mladin s přídavkem m-FDA po 24 h při 20 °C.

1 - pH 5,5, m-FDA 0,25 g.l⁻¹, 2 - pH 4,7, m-FDA 0,25 g.l⁻¹, 3 - vzorek 1 bez m-FDA, 4 - vzorek 2 bez m-FDA

Ze získaných výsledků je dobře patrný přírůstek absorbance reakcí složek mladiny s m-FDA bez účasti dusitanů. Zbarvení mladiny bylo žluté až žlutohnědé a jeho intenzita nezávisela na hodnotě pH 4,7 a 5,5. Přírůstek absorbance při 450 nm byl asi 0,4 AU (absorbančních jednotek) za den.

3.2 Reakce m-FDA s 12% pivem

12% pastерованé pivo (pH 4,5) se zbavilo třepáním oxidu uhličitýho a asepticky se přidal 1% sterilní roztok m-FDA ve výsledné koncentraci m-FDA 0,25 g.l⁻¹. Absorpční spektra se měřila po 1 a 3 dnech při 20 °C proti destilované vodě (obr.2).



Obr.2 Absorpční spektra 12% piva s přidavkem m-FDA při 20 °C. 1 - srovnávací vzorek, 2 - vzorek 1 + m-FDA 0,25 g.l⁻¹, 3 - vzorek 1 po 1 dni, 4 - vzorek 2 po 1 dni, 5 - vzorek 1 po 3 dnech, 6 - vzorek 2 po 3 dnech

Také s 12% pivem reagoval m-FDA za tvorby žlutého zbarvení, jehož intenzita vzrůstala s časem. Přírůstek absorbance byl asi 0,15 AU za den.

3.3 Reakce m-FDA s pivem upraveným stabilizačními prostředky

Obsah bílkovin v 12% pivu se snížil 0,5 h třepáním se Stabiquickem 83 (200 g.hl⁻¹), obsah tríslovin třepáním s Polyclarem R (100 g.hl⁻¹). Absorpční spektra piv s přidavkem m-FDA (0,25 g.l⁻¹) a bez něj se měřila po 3 dnech při 20 °C proti destilované vodě (obr.3).

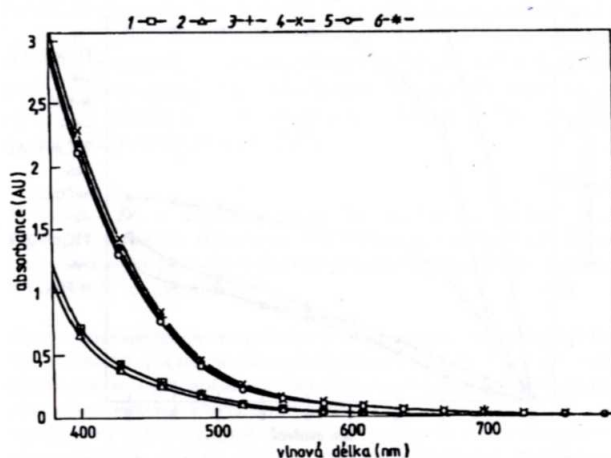
Snížení obsahu bílkovin a tríslovin se na intenzitě reakce s m-FDA výrazně neprojevovalo.

3.4 Reakce m-FDA se sacharidy a fenoly

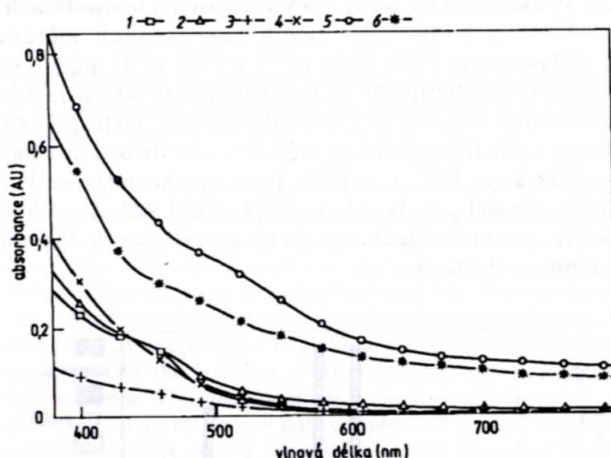
K asepticky připraveným 10% roztokům glukosy, maltosy, fruktosy a sacharosy v citrátovém pufru (pH 5,0) se přidal 1% roztok m-FDA ve výsledné koncentraci 0,25 g.l⁻¹. Podobně se připravily roztoky pyrokatechinu a taninu (1 g.l⁻¹) v citrátovém pufru. Absorpční spektra se měřila po 3 dnech při 20 °C proti destilované vodě (obr.4). Přírůstky absorbancí se u sacharidů pohybovaly okolo 0,05 AU za den.

Stejným způsobem se proměřila spektra roztoků bez přidavku m-FDA. Absorbance těchto roztoků při 450 nm byly po 3 dnech nižší, než 0,05 AU. Z výsledků měření je

patrné, že barevné reakce s m-FDA se mohou účastnit fenoly i cukry.



Obr.3 Absorpční spektra 12% piv upravených stabilizačními prostředky s přidavkem m-FDA po 3 dnech při 20 °C. 1 - 12% pastерованé pivo, 2 - vzorek 1 + Polyclar R, 100 g.hl⁻¹, 3 - vzorek 1 + Stabiquick 83, 200 g.hl⁻¹, 4 - vzorek 1 + m-FDA 0,25 g.l⁻¹, 5 - vzorek 2 + m-FDA 0,25 g.l⁻¹, 6 - vzorek 3 + m-FDA 0,25 g.l⁻¹.



Obr.4 Absorpční spektra roztoků sacharidů a fenolů v citrátovém pufru (pH 5,0) s přidavkem m-FDA po 3 dnech při 20 °C. 1 - 10% glukosa, 2 - 10% maltosa, 3 - 10% sacharosa, 4 - 10% fruktosa, 5 - pyrokatechin (1g.l⁻¹), 6 - tanin (1g.l⁻¹)

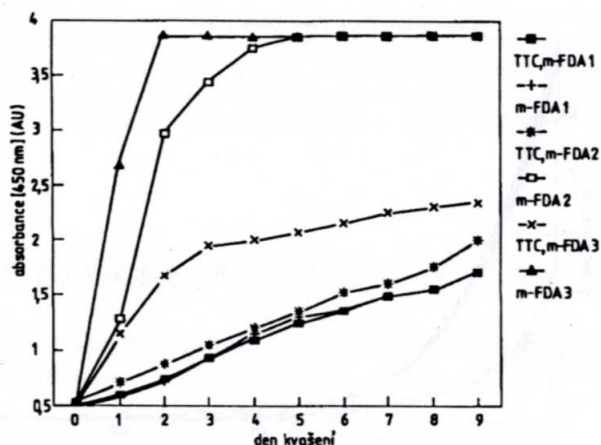
3.5 Absorpční spektra piva s hydrochloridem tetracyklinu (TTC)

Absorpční spektra roztoků hydrochloridu tetracyklinu (50 a 100 mg.l⁻¹) v destilované vodě a v 12% pivu se proměřovala po rozpuštění a po 24 h při 20 °C. Při 450 nm byl přírůstek absorbancí, odpovídající za přidavek TTC v obou případech zanedbatelný, při nižších vlnových délkách hodnota absorbance roztoků narůstala a dosahovala při 380 nm 2 AU při koncentraci 100 mg.l⁻¹ TTC.

3.6 Časový průběh absorbancí

Vzorky zakvašené mladiny s různým stupněm kontaminace se kultivovaly při 20 °C s přidavkem m-FDA, nebo TTC a m-FDA podle odst.2.3. V pravidelných časových

intervalech se měřila absorbance odstředěných vzorků proti destilované vodě (obr.5).

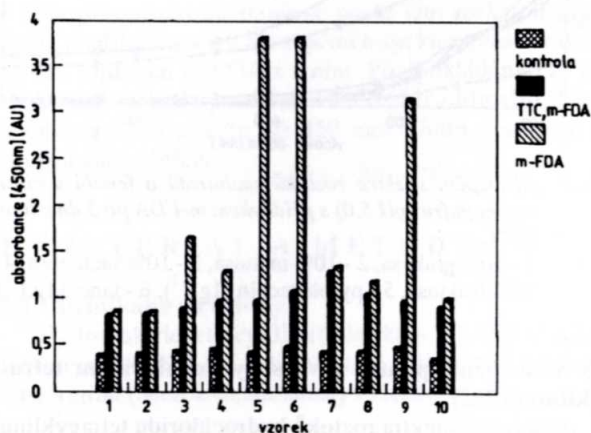


Obr.5 Časový průběh absorbance reakce kvasící kontaminované mladiny s m-FDA.

1 - málo kontaminovaná mladina, 2 - středně kontaminovaná mladina, 3 - silně kontaminovaná mladina

3.7 Průkaz tvorby dusitanů v zakvašených mladínách

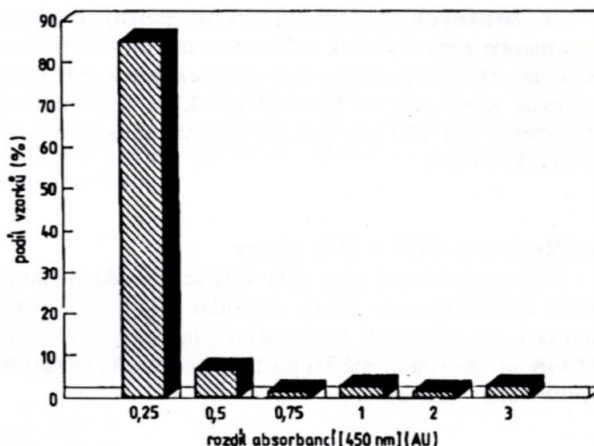
Vzorky kontaminovaných zakvašených mladín s přídavkem m-FDA ($0,25 \text{ g.l}^{-1}$) a TTC (100 mg.l^{-1}) se kultivovaly 3 dny při 20°C . Po odstředění vzorků se měřila absorbance při 450 nm proti destilované vodě (obr.6). Podle výsledků měření se přírůstek absorbance mladiny s přídavkem TTC a m-FDA proti vzorku mladiny bez těchto činidel pohyboval mezi 0,4 až 0,9 AU. Z obr.6 je dobře patrné následné zvýšení absorbance u vzorků s tvorbou dusitanů.



Obr.6 Průkaz dusitanů v kvasících mladínách po 3 dnech při 20°C

3.8 Sledování tvorby dusitanů v zakvašených mladínách

Pro rutinní kontrolu zakvašených mladín se sledovala tvorba dusitanů testem s m-FDA podle odst. 2.3. K vzorkům čerstvě zakvašených mladín se přidával m-FDA a TTC a jako měřítka tvorby dusitanů se volil rozdíl absorbancí obou vzorků při 450 nm po 5 dnech při 20°C (obr.7).



Obr.7 Rozdělení vzorků podle rozdílu absorbancí při 450 nm proti srovnávacímu vzorku s TTC

4. DISKUSE

Při sledování tvorby dusitanů v zakvašené mladíně se využívá citlivé reakce dusitanů s m-FDA, při které vzniká barvivo s absorpčním maximem při 450 nm. Kromě toho může m-FDA reagovat i se složkami mladiny a piva. Při této reakci nevzniká barvivo s charakteristickým maximem, ale křivka absorbance ve viditelné oblasti spektra plynule klesá se vzrůstající vlnovou délkou.

Tím se absorpční spektrum mladiny, nebo piva po reakci s m-FDA podobá absorpční křivce těchto substrátů s posunutím k vyšším hodnotám absorbancí. V důsledku toho se jeví působení m-FDA na mladinu, nebo pivo, jako přibarvení těchto substrátů do žluta až hněda.

Nárůst absorbance činí asi 0,4 AU za den u mladiny, u piva je přibližně poloviční. Podle orientačního průzkumu vlivu jednotlivých složek se na přibarvování podílejí sacharidy i fenoly. Průběh reakce je relativně pomalý, neboť při lineárním nárůstu absorbance lze předpokládat pouze nízkou spotřebu obou složek reakce.

Z fenolů se pravděpodobně uplatňují nízkomolekulární složky, neboť absorpce polyfenolů Polyclarem R nesnižovala po reakci barvu piva.

Přírůstek absorbance vlivem sacharidů je sice slabý, ale předem zahřívání roztoky sacharidů poskytovaly silnější barevnou reakci. Ze sacharidů přednostně reagovaly redukující cukry s volnou aldehydickou, nebo ketoskupinou.

Neredukující sacharosa reagovala s m-FDA velmi slabě. Patrně rovněž záleží na konfiguraci cukru v roztoku. Kromě toho barevnou reakci poskytují i další látky, např. kyselina askorbová, nebo formaldehyd, které ovšem nepatří mezi složky mladiny.

Z těchto důvodů nelze reakci s dusitanem považovat za zcela specifickou.

Absorpční křivka barevného produktu dusitanu s m-FDA má sice typické absorpční maximum, při reakci dusitanu v mladíně, nebo pivu však mohou rušící látky tvorbu maxima potlačovat. Navíc nelze při jedné vlnové délce rozlišit příčinu nárůstu absorbance.

Proto jsme testovali stanovení tvorby dusitanu s přídavkem TTC, který měl potlačovat činnost bakterií, redukujících dusičnany. Tím se jako srovnávací pokus

mohl použít vzorek, v němž sice proběhla reakce složek mladiny s m-FDA, ale netvořil se dusitan (viz obr.5).

Získané výsledky potvrzují použitelnost testu, neboť vznikající dusitan zvyšoval dále absorbanci nad hodnotu srovnávacího pokusu. Jako testovací kritérium pro tvorbu dusitanů v kvasici mladiny proto navrhuje volit zvýšení absorbance proti srovnávacímu vzorku s TTC (viz obr.6,7).

Podle časového průběhu absorbance kvasících mladiny s přídavkem m-FDA a TTC lze při potlačení činnosti bakterií zaznamenat nárůst absorbance pouze vlivem reakce složek mladiny s m-FDA. U kontaminovaných mladiny se absorbance zvyšuje ještě reakcí m-FDA s dusitanem (obr.5).

Doba potřebná pro vyhodnocení testu se pohybuje mezi 3 až 5 dny. U některých vzorků nemusí TTC vždy potlačit veškeré bakterie, zejména pokud jsou přítomny ve velkém množství. Tím se zvyšuje absorbance i u vzorku s TTC a částečně přibarvují i srovnávací vzorky (obr.5, křivka TTC, mFDA 3). Zde bude nutné vyzkoušet další antibiotika, popř. jejich kombinace.

Zvolená modifikace testu nenapodobuje zcela podmínky při hlavním kvašení, neboť činnost i růst bakterií rovněž závisí na teplotě. Pro získání přesných hodnot proto doporučujeme test při nižších teplotách, blízcích se teplotám hlavního kvašení. Jedině tímto způsobem lze dosáhnout spolehlivého výsledku i ve sporných případech rychlého orientačního testu. Teplota stanovení se přitom musí dodržovat s přesností alespoň $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Test jsme ověřovali na souboru 75 zakvašených mladiny, z nichž většina poskytovala negativní reakci na tvorbu dusitanu (obr.7). Výhodou testu je jeho jednoduchost, spolehlivost a použitelnost v běžné laboratorní kontrole.

Závěrem je nutné uvést, že úspěšné využití testu v provozních podmínkách dále závisí na volbě a četnosti vzorků, vyhodnocování výsledků a správné strategii provozních zásahů a opatření. Při splnění všech těchto podmínek lze podle našeho názoru dosáhnout spolehlivého odstranění negativního působení dusitanů, např. tvorby ATNC ve vyráběných pivech.

LITERATURA

- [1] CALDERBANK, J. - HAMMOND, J. R. M.: J. Inst. Brew., 95, 1989, s. 277
- [2] ŠROGL, J. - KOŘÁN, M. - ČEPIČKA, J.: Kvas. prům., 38, 1992, s. 201
- [3] SMITH, N. A. - SMITH, P.: J. Inst. Brew., 98, 1992, s. 409.
- [4] SMITH, N. A.: J. Inst. Brew., 98, 1992, s. 415
- [5] KELLNER, V. et al.: Kvas. prům., 37, 1991, s. 193.
- [6] FOSTER, A.: Brauwelt, 128, 1988, s. 188.
- [7] ČEPIČKA, J. - BAUDYŠ, P. - VÍZNEROVÁ, E. - KRAUSOVÁ, J.: Kvas. prům., 37, 1991, s. 230.
- [8] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům., 38, 1992, s. 321.
- [9] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M. - ZDVIHALOVÁ, D.: Kvas. prům., 38, 1992, s. 350.

Lektoroval doc. Ing. J. ČEPIČKA, CSc.
Do redakce došlo 24.3.1993

ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M. - ZDVIHALOVÁ, D.: Praktické použití reakce kvasící mladiny s m-fenylendiaminem. Kvas. prům., 39, 1993, č. 6, s. 166 - 169

Článek pojednává o testu s m-fenylendiaminem (m-FDA), používaném pro sledování tvorby dusitanů během kvašení. m-FDA se přidá do zakvašené mladiny a při kvašení kontaminovaných mladiny reaguje s vznikajícím dusitanem a částečně i se složkami mladiny. Prokázala se reakce m-FDA se sacharidy, fenoly i ostatními látkami, např. kyselinou askorbovou. Doporučuje se provádět test s m-FDA souběžně s přídavkem antibiotika, např. hydrochloridem tetracyklinu. Měřítkem tvorby dusitanů je rozdíl absorbancí obou vzorků při 450 nm. Tento rychlý screeningový test je vhodný pro předběžnou identifikaci kvasících mladiny s předpokládaným nevyhovujícím obsahem netěkavých nitrosaminů (ATNC).

minovaných mladiny reaguje s vznikajícím dusitanem a částečně i se složkami mladiny. Prokázala se reakce m-FDA se sacharidy, fenoly i ostatními látkami, např. kyselinou askorbovou. Doporučuje se provádět test s m-FDA souběžně s přídavkem antibiotika, např. hydrochloridem tetracyklinu. Měřítkem tvorby dusitanů je rozdíl absorbancí obou vzorků při 450 nm. Tento rychlý screeningový test je vhodný pro předběžnou identifikaci kvasících mladiny s předpokládaným nevyhovujícím obsahem netěkavých nitrosaminů (ATNC).

Шавел, Я. - Прокопова, М. - Здвигалова, Д.: Практическое применение реакции бродящего охмеленного сусла с м-фенилендиаминном. Квас. прум., 39, 1993, № 6, стр. 166-169

Статья занимается тест-пробой с м-фенилендиаминном (м-ФДА), применяемой для исследования образования нитратов в течение брожения. м-ФДА добавляется в бродящее охмеленное сусло и при сбраживании загрязненных охмеленных сусел он реагирует с возникающим нитратом и отчасти и с компонентами охмеленного сусла. Была доказана реакция м-ФДА с сахарами, фенолами и остальными веществами, напр. аскорбиновой кислотой. Рекомендуется проводить тест-пробу с м-ФДА параллельно с добавкой антибиотика, напр. гидрохлорида тетрациклина. Образцовой мерой образования нитратов является разница поглощаемостей обеих проб при 450 нм. Этот быстросействующий скрининг-тест пригоден для предварительной идентификации бродящих охмеленных сусел с предполагаемым неудовлетворяющим содержанием нелетучих нитрозаминов (АТНЦ).

Šavel, J. - Prokopová, M. - Zdvihlová, D.: Practical Application of the Reaction of Fermenting Hopped Wort with m-Phenylendiamine. Kvas. prům., 39, 1993, No. 6, pp 166 - 169

The test with m-phenylendiamine (m-FDA) is used for an investigation of the formation of nitrites during a fermentation. m-FDA is added into the inoculated hopped wort. During the fermentation of contaminated worts it reacts with nitrite formed and partially with some compounds of wort, too. The reaction of m-FDA with saccharides, phenols and other compounds such as ascorbic acid was proved. The m-FDA test should be performed together with the addition of an antibiotic, e.g. tetracycline hydrochloride. The quantity of the nitrite formation is given by the change of absorbance of both samples at 450 nm. This quick screening test is proper for a preliminary identification of fermented worts containing higher levels of nonvolatile nitrosamines (ATNC).

ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M. - ZDVIHALOVÁ, D.: Praktische Anwendung der Reaktion der gärenden Würze mit m-Fenylendiamin. Kvas. prům., 39, 1993, Nr. 6, S. 166 - 169

Der Artikel informiert über den Test mit m-Fenylendiamin (m-FDA), der zur Verfolgung der Nitrit-Bildung während der Gärung angewandt wird. m-FDA wird in die Würze nach dem Anstellen zugegeben und reagiert bei der Gärung von kontaminierten Würzen mit dem entstehenden Nitrit und teilweise auch mit den Würze - Bestandteilen. Es wurde die Reaktion von m-FDA mit den Sacchariden, Phenolen und auch anderen Substanzen, z.B. der Ascorbinsäure, bewiesen. Es wird empfohlen, den Test mit m-FDA parallel mit der Zugabe des Antibiotikums, z.B. Hydrochlorid des Tetrazyklins durchzuführen. Als Maß der Nitritbildung gilt der Unterschied der Absorbanz beider Proben bei 450 nm. Dieser schnelle Screening-Test eignet sich für die vorläufige Identifikation der gärenden Würzen mit vorausgesetzt nichtentsprechendem Gehalt nichtflüchtiger Nitrosamine (ATNC).